

# **Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)**

International application number: PCT/KR05/000453

International filing date: 18 February 2005 (18.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: KR

Number: 10-2004-0011517

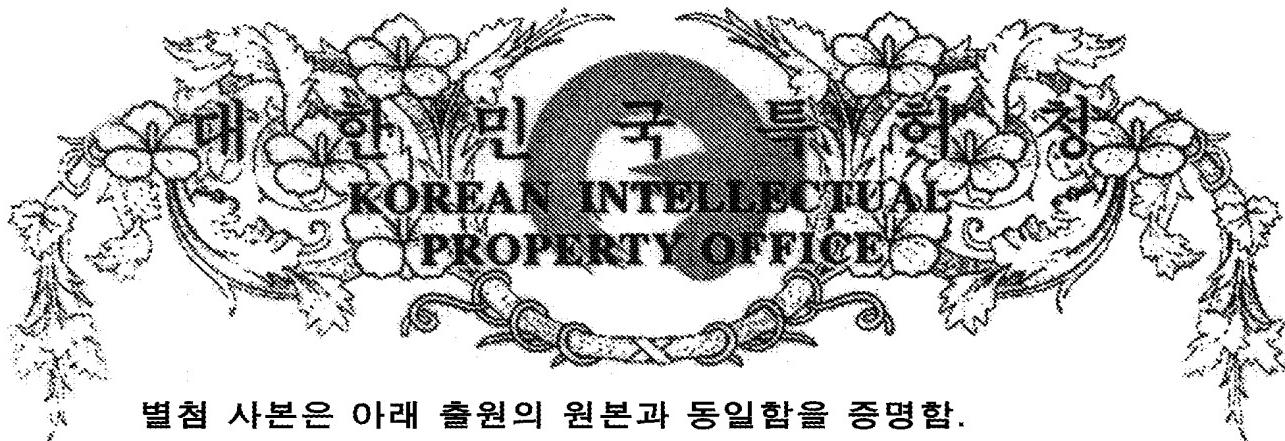
Filing date: 20 February 2004 (20.02.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 17 May 2005 (17.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto  
is a true copy from the records of the Korean Intellectual  
Property Office

출 원 번 호 : 특허출원 2004년 제 0011517 호  
Application Number 10-2004-0011517

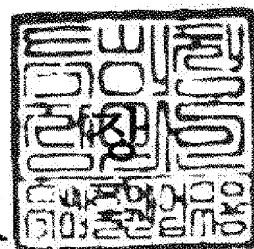
출 원 일 자 : 2004년 02월 20일  
Date of Application FEB 20, 2004

출 원 인 : 제노마인(주) 외 1 명  
Applicant(s) GENOMINE INC., et al

2005 년 04 월 07 일

특 허 청

COMMISSIONER



## 【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2004.02.20
【발명의 국문명칭】	피리독신 생합성 관련 기능을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드
【발명의 영문명칭】	Polynucleotide Coding Polypeptide Having Function Related to Pyridoxine Biosynthesis
【출원인】	
【명칭】	제노마인(주)
【출원인코드】	1-1999-062412-6
【출원인】	
【명칭】	한국화학연구원
【출원인코드】	3-1998-007765-1
【대리인】	
【성명】	강경찬
【대리인코드】	9-2001-000096-7
【포괄위임등록번호】	2004-011054-5
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이동희
【성명의 영문표기】	LEE,Dong-hee
【주민등록번호】	650404-1101511
【우편번호】	614-871
【주소】	부산광역시 부산진구 초읍동 252-1 반도맨션 410호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김태훈

【성명의 영문표기】	KIM,Tae-hoon		
【주민등록번호】	730716-1122320		
【우편번호】	609-320		
【주소】	부산광역시 금정구 부곡동 264-8		
【국적】	KR		
【발명자】			
【성명의 국문표기】	황인택		
【성명의 영문표기】	HWANG, In-taeck		
【주민등록번호】	571225-1495611		
【우편번호】	305-755		
【주소】	대전광역시 유성구 어은동 한빛아파트 115-303		
【국적】	KR		
【발명자】			
【성명의 국문표기】	조광연		
【성명의 영문표기】	CHO,Kwang-yun		
【주민등록번호】	460326-1046511		
【우편번호】	305-340		
【주소】	대전광역시 유성구 도룡동 383-21		
【국적】	KR		
【핵산염기 및 아미노산 서열목록】			
【서열개수】	6		
【서열목록의 전자문서】	첨부		
【취지】	특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 대 리인 찬 (인)		
【수수료】			
【기본출원료】	60	면	38,000 원

<b>【가산출원료】</b>	0	면	0	원
<b>【우선권주장료】</b>	0	건	0	원
<b>【심사청구료】</b>	0	항	0	원
<b>【합계】</b>	38,000	원		
<b>【감면사유】</b>		정부출연연구기관		
<b>【감면후 수수료】</b>	19,000	원		
<b>【첨부서류】</b>	1.	소기업임을 증명하는 서류_1통		

## 【요약서】

### 【요약】

본 발명은 피리독신 생합성 관련 기능을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 개시한다. 또한 본 발명은 상기 폴리뉴클레오티드에 의하여 코딩되는 피리독신 생합성 관련 기능을 갖는 폴리펩티드, 상기 폴리뉴클레오티드에 대한 안티센스 뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터, 이러한 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체, 식물의 생장을 억제하는 방법, 식물의 생장을 억제하는 물질의 스크리닝 방법, 및 상기 스크리닝 방법을 통하여 얻어진 물질을 포함하는 식물의 생장 억제용 조성물을 개시한다.

### 【대표도】

도 1

### 【색인어】

피리독신, 생합성, 폴리뉴클레오티드, 안티센스, 식물 생장 억제 물질, 스크리닝

## 【명세서】

### 【발명의 명칭】

파리독신 생합성 관련 기능을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드  
{Polynucleotide Coding Polypeptide Having Function Related to Pyridoxine Biosynthesis}

### 【도면의 간단한 설명】

- <1>      도 1은 본 발명의 파리독신 생합성 관련 기능을 갖는 폴리펩티드의 아미노산 서열, 특히 서열번호 2의 아미노산 서열을 SOR/SNZ 패밀리가 포함된 정지기 유도 단백질(stationary phase-induced protein)인 KOG1606 패밀리를 함유한 단백질들의 아미노산 서열과 클러스털(Clustal)W를 이용하여 비교한 것이다.
- <2>      도 2는 본 발명의 파리독신 생합성 관련 기능을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 특히 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드가 포함된 재조합 벡터로 형질전환된 대장균 및 대조군 대장균 용출액에 대한 SDS-PAGE 분석 결과를 나타낸 것이다.
- <3>      도 3a는 본 발명의 파리독신 생합성 관련 기능을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 특히 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드가 도입될 벡터의 구조(모식도)를 나타낸 것이다.
- <4>      도 3b는 본 발명의 파리독신 생합성 관련 기능을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 특히 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드가

도입된 벡터의 구조(모식도)를 나타낸 것이다.

<5>         도 4는 본 발명의 피리독신 생합성 관련 기능을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 특히 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드에 대한 안티센스 뉴클레오티드가 도입된 T1 형질전환 애기장대의 종자에서 자란 유묘(바스타 제초제를 처리하여 생장, 분화된 유묘)의 사진이다.

<6>         도 5a는 본 발명의 피리독신 생합성 관련 기능을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 특히 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드에 대한 안티센스 뉴클레오티드가 도입된 T2 형질전환 애기장대의 종자에서 7일 동안 자란 유묘(피리독신을 첨가한 페트리 디쉬에서 생장, 분화된 유묘)의 사진이다.

<7>         도 5b는 본 발명의 피리독신 생합성 관련 기능을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 특히 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드에 대한 안티센스 뉴클레오티드가 도입된 T2 형질전환 애기장대의 종자에서 7일 동안 자란 유묘(피리독신을 첨가하지 않은 페트리 디쉬에서 생장, 분화된 유묘)의 사진이다.

<8>         도 5c는 본 발명의 피리독신 생합성 관련 기능을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 특히 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드에 대한 안티센스 뉴클레오티드가 도입된 T2 형질전환 애기장대의 종자에서 19일 동안 자란 유묘(피리독신을 첨가한 페트리 디쉬에서 생장, 분화된 유묘)의 사진이다.

<9>         도 5d는 본 발명의 피리독신 생합성 관련 기능을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 특히 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드에

대한 안티센스 뉴클레오티드가 도입된 T2 형질전환 애기장대의 종자에서 19일 동안 자란 유묘(피리독신을 첨가하지 않은 페트리 디쉬에서 생장, 분화된 유묘)의 사진이다.

<10>        도 6a는 본 발명의 피리독신 생합성 관련 기능을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 특히 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드에 대한 안티센스 뉴클레오티드가 도입된 T2 형질전환 애기장대의 종자에서 7일 동안 자란 유묘(어떠한 비타민 B6군도 첨가하지 않은 페트리 디쉬에서 생장, 분화된 유묘)의 사진이다.

<11>        도 6b는 본 발명의 피리독신 생합성 관련 기능을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 특히 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드에 대한 안티센스 뉴클레오티드가 도입된 T2 형질전환 애기장대의 종자에서 7일 동안 자란 유묘(피리독신을 첨가한 페트리 디쉬에서 생장, 분화된 유묘)의 사진이다.

<12>        도 6c는 본 발명의 피리독신 생합성 관련 기능을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 특히 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드에 대한 안티센스 뉴클레오티드가 도입된 T2 형질전환 애기장대의 종자에서 7일 동안 자란 유묘(피리독사민(pyridoxamine)을 첨가한 페트리 디쉬에서 생장, 분화된 유묘)의 사진이다.

<13>        도 6d는 본 발명의 피리독신 생합성 관련 기능을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 특히 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드에 대한 안티센스 뉴클레오티드가 도입된 T2 형질전환 애기장대의 종자에서 7일 동안

자란 유묘(피리독살(pyridoxal)을 첨가한 페트리 디쉬에서 생장, 분화된 유묘)의 사진이다.

<14> 도 6e는 본 발명의 피리독신 생합성 관련 기능을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 특히 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드에 대한 안티센스 뉴클레오티드가 도입된 T2 형질전환 애기장대의 종자에서 7일 동안 자란 유묘(피리독살-5-인산(pyridoxal-5-phosphate)를 첨가한 페트리 디쉬에서 생장, 분화된 유묘)의 사진이다.

### 【발명의 상세한 설명】

#### 【발명의 목적】

#### 【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<15> 본 발명은 피리독신 생합성 관련 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드에 의하여 코딩되는 피리독신 생합성 관련 기능을 갖는 폴리펩티드, 상기 폴리뉴클레오티드에 대한 안티센스 뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터, 이러한 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체, 식물의 생장을 억제하는 방법, 식물의 생장을 억제하는 물질의 스크리닝 방법, 및 상기 스크리닝 방법을 통하여 얻어진 물질을 포함하는 식물의 생장 억제용 조성물에 관한 것이다.

<16> 피리독신은 비타민 B6군의 한 종류로서, 동물이나 식물의 생장에 필수적인

비타민이다. 피리독신 이외에 피리독사민, 피리독살, 그리고 다양한 그 유도체 등이 비타민 B6군에 포함되며, 이러한 성분들은 인간 및 동물체에서 피리독살-5-인산(PLP)으로 전환된다. PLP는 모든 생물체에서 질소 대사 작용에 관여할 뿐만 아니라 아미노산 대사 등 생체 내 다양한 대사 작용에 관여하는 조효소인 것으로 알려지고 있다. 박테리아, 식물 및 몇몇 균은 자체 내에서 피리독신을 합성할 수 있는 반면, 대부분의 동물 및 인간은 피리독신 생합성 과정이 결여되어 있기 때문에 외부 환경으로부터 피리독신을 반드시 섭취하여야 한다. 비타민 B6군 중 인간과 동물들의 영양 공급원으로서 대표적인 것이 피리독신이다.

<17> 이러한 피리독신 생합성 경로에 관한 연구는 대장균(*Escherichia coli*)에서 먼저 시작되었고, 많은 학자들의 생화학적 및 유전학적 연구를 통하여 박테리아의 피리독신 생합성 경로가 규명되고 있다. 대장균에서 피리독신 요구 돌연변이체를 활용한 유전학적 연구를 통하여 4개의 유전자(*pdxA*, *pdxB*, *pdxJ*, *pdxF*)가 피리독신 생합성에 관여한다는 것이 밝혀져 있으며, 동위원소 라벨링(labelling) 연구를 통하여 1-디옥시-D-실룰로스(1-deoxy-D-xylulose)와 4-히드록시-L-트레오닌(4-hydroxy-L-threonine)이 피리독신의 전구체로 제공된다고 알려지고 있다(Yang et al., *J Bacteriol.*, 180: 1814-1821, 1998; Laber et al., *FEBS Letters*, 449: 45-48, 1999). *pdxB*와 *pdxF*는 4-히드록시-L-트레오닌의 생합성에 관여하는 반면, *pdxA*와 *pdxJ*는 1-디옥시-D-실룰로스와 4-히드록시-L-트레오닌, 두 성분으로부터 피리독신의 생합성 과정에 중요한 역할을 담당하는 것으로 제안되고 있다(Hill et al., *J. Biol. Chem.*, 271: 30426-30435).

한편, 피리독신 생합성 경로에 있어서 흥미로운 점은 진핵생물의 피리독신 생합성 질소원이 원핵생물인 대장균의 질소원과 서로 다르다는 제안이다(Tazuya *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta.* 1244: 113-116, 1995). 이러한 제안은 동위원소 라벨링(labelling) 연구를 통하여 글루타민(glutamine)이 영양 효모인 사카로마이세스 세례비제(*Saccharomyces cerevisiae*)의 피리독신으로 효과적으로 삽입되는 반면, 대장균의 피리독신으로는 삽입이 되지 않는다는 결과에 기인하고 있다. 또한 많은 학자들이 피리독신 영양 요구 돌연변이체를 통하여 진핵 생물의 피리독신 생합성 경로를 연구하고 있다. 식물병원균류인 세르코스포라 니코티아네(*Cercospora nicotiana*)로부터 분리된 *Sor1* 유전자는 활성 산소에 대한 방어 기작을 제공하는 것으로 알려지고 있으나, 특이한 점은 *sor1* 돌연변이체는 피리독신의 외부 공급이 제한되면 생존에 심각한 문제를 야기하며, 심지어 피리독신의 공급이 끊어지면 치사를 유발한다는 것이다(Ehrenshaft *et al.*, *Curr. Genet.*, 34: 478-485, 1999). 이러한 사실은 본 유전자가 피리독신 생합성 경로에 관여하는 중요한 유전자인 것으로 추측된다. 최근 아스페질러스 니두란스(*Aspergillus nidulans*)등에서 *Sor1* 동족체(homologue)인 *Pdx1* 유전자가 동정되었으며, 이와 유전적으로 연관된 *Pdx2*(혹은 *SNZ*) 유전자 또한 동정되고 있는 중이다(Osamii *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 274: 23565-23569, 1999; Ehrenshaft and Daub, *J. Bacteriol.*, 183: 3383-3390, 2001). 흥미로운 점은 이러한 유전자들이 대장균에선 그 동족체가 나타나지 않는다는 것이다. 이러한 사실은 앞서 언급한 바와 같이 대장균의 피리독신 생합성 경로와 진핵 생물의 생합성 경로가 많은 차이점을 가진다는 것을 시사한다.

<19> 그러나 이러한 많은 연구에도 불구하고 여전히 진핵 생물에 대한 피리독신 생합성 경로는 아직 완벽하게 구명되지 않고 있으며, 특히 식물에서는 그 정도가 더 심하다. 현재 식물에선, 피리독신 생합성에 관련된 유전자로 알려진 것은 애기장대( *Arabidopsis thaliana* ) 피리독살 카이네이제(piridoxal kinase)로 알려진 *SOS4* 유전자 외에 몇 종 밖에 없으며(Shi et al., *Plant Cell*, 14: 575-588, 2002), 앞서 언급된 *Pdx1*과 *Pdx2* 동족체에 대한 애기장대 유전자의 분석도 아직 명확하지 않은 실정이다. 따라서 모델 식물인 애기장대에서 피리독신 생합성 관련 유전자를 분리하고 분석하는 것은 식물체의 피리독신 생합성 경로를 밝히는데 중요하며, 특히, 영양소 요구 돌연변이체의 연구와 같은 정밀한 돌연변이 연구는 피리독신 생합성과 조절에 대해 보다 많은 정보를 제공할 것이다.

<20> 이러한 연구들은 식물의 피리독신 생합성 경로에 대한 연구가 환경친화적인 제초제의 개발에 대한 가능성을 제공할 수 있음을 제시한다. 즉, 피리독신 생합성 경로는 식물의 생장에는 필수적이지만, 동물 및 인간에게는 존재하지 않기 때문에, 피리독신 생합성을 저해한다면, 동물이나 인간에게는 영향을 미치지 않으면서, 유해한 식물의 생장을 효과적으로 억제할 수 있는 가능성이 크다고 할 수 있다. 그러나 아직까지 식물의 피리독신 생합성 과정에 대해서는 완전하게 알려져 있지 않을 뿐만 아니라, 생합성 과정에 관계된 유전자를 표적으로 하여 환경친화적이면서도 유해한 식물의 생장을 효과적으로 억제할 수 있는 방법에 대해서는 연구가 거의 없는 실정이다. 또한, 종래 사용되었던 대부분의 제초제의 경우, 식물체내에서의 대사 기능을 명확하게 파악하지 못하고 있는 실정이다.

<21> 이에 본 연구자들은 애기장대를 대상으로 피리독신 생합성 경로에 대한 연구를 수행하여 피리독신 생합성 경로에 관여하는 폴리펩티드 및 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 분리하고 그 기능을 분석하였다. 또한, 상기 폴리펩티드의 발현을 억제하거나 그 기능을 억제하는 것이, 식물의 생장에 치명적인 영향을 미침을 확인하여 상기 폴리뉴클레오티드와 이로부터 발현된 폴리펩티드에 대한 억제 물질이 환경 친화적인 제조체로서 사용될 수 있음을 밝혀냄으로써 본 발명을 완성하였다.

### 【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<22> 따라서 본 발명의 목적은 피리독신 생합성 관련 기능을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공하는 데 있다.

<23> 본 발명의 또 다른 목적은 피리독신 생합성 관련 기능을 갖는 폴리펩티드를 제공하는데 있다.

<24> 본 발명의 또 다른 목적은 상기 폴리뉴클레오티드에 대한 안티센스 뉴클레오티드를 제공하는데 있다.

<25> 본 발명의 또 다른 목적은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터 및 이러한 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공하는데 있다.

<26> 본 발명의 또 다른 목적은 식물의 생장을 억제하는 방법을 제공하는데 있다.

<27> 본 발명의 또 다른 목적은 식물의 생장을 억제하는 물질의 스크리닝 방법을 제공하는데 있다.

<28> 본 발명의 또 다른 목적은 상기 스크리닝 방법을 통하여 얻어진 물질을 포함

하는 식물의 생장 억제용 조성물을 제공하는데 있다.

### 【발명의 구성】

<29> 본 발명은 일 측면에 있어, 피리독신 생합성 관련 기능을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

<30> 본 발명자(들)는 하기 실시예에서 확인되는 바와 같이, 애기장대의 피리독신 생합성과 관련되어 있다고 추정되는 단백질(GeneBank accession number NP 19576 1)의 아미노산 서열을 기초로 하여 제작된 프라이머를 사용하여 애기장대로부터 전장 cDNA를 얻고, 그것의 염기서열 즉 서열번호 1의 염기서열과, 전사 해독 틀(Open Reading Frame)에 기초한 아미노산 서열 즉 서열번호 2의 아미노산 서열을 분석하여 그것이 코딩하는 폴리펩티드의 분자량을 추정한 후, 그 cDNA를 포함하는 재조합 발현 벡터를 대장균에 형질 전환시켜 발현시키고 그로부터 얻어진 폴리펩티드의 분자량을 분석한 결과 위 추정된 분자량과 같음을 확인하였고, 나아가 위 cDNA의 염기서열 즉 서열번호 1에 기초하여 제작된 안티센스 뉴클레오티드를 애기장대에 형질 전환시켜 본 결과, 피리독신 영양소 요구 돌연변이체인 형질전환된 애기장대가 얻어짐을 확인할 수 있었다. 특히, 피리독신 영양소 요구 돌연변이체는 피리독신, 피리독살, 피리독살-5-인산과 같은 여러 비타민 B6군 중 오로지 피리독살의 처리에 의해서만 그 표현형이 회복된다는 사실, 및 이러한 사실로부터 상기 폴리펩티드는 B6군에 속하는 비타민 중 피리독살의 생합성에 직접적으로 관여하는 것임을 확인할 수 있었다.

<31> 그러므로, 상기에서 그리고 청구범위를 포함하는 이하에서, "피리독신 생합

성 관련 기능"이란 피디독신 생합성에 필수적인 기능을 의미한다.

<32> 구체적으로, 본 발명의 피리독신 생합성 관련 기능을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는, 하기 (a), (b), (c) 및 (d)의 폴리뉴클레오티드들 중 하나이다.

<33> (a) 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열 전체를 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드;

<34> (b) 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열의 실질적인 부분을 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드;

<35> (c) 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열 전체를 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드와 실질적으로 유사한 단리된 폴리뉴클레오티드; 및

<36> (d) 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열의 실질적인 부분을 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드와 실질적으로 유사한 단리된 폴리뉴클레오티드

<37> 상기에서 그리고 청구범위를 포함하는 이하에서, "단리된 폴리뉴클레오티드"는 화학적으로 합성된 폴리뉴클레오티드, 생물체 특히 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)에서 분리된 폴리뉴클레오티드 및 변형된 뉴클레오티드를 함유한 폴리뉴클레오티드를 모두 포함하며, 단일 가닥 또는 이중 가닥의 RNA 또는 DNA의 중합체를 모두 포함하는 것으로서 정의된다. 그러므로 상기 "단리된 폴리뉴클레오티드"란 cDNA를 포함하여 뉴클레오티드들을 화학적으로 중합시킨 폴리뉴클레오티드 뿐만 아니라, 나아가 생물체 특히 애기장대에서 분리되는 gDNA를 포함한다. 여기서, 본 발명의 개시 내용, 특히 서열번호 2의 아미노산 서열 및 이를 코딩하는 서열번호 1의

염기서열, 및 당 업계에 공지된 기술 등에 기초하는 한, cDNA를 포함하여 상기 학적 합성되는 폴리뉴클레오티드의 제조 및 상기 gDNA의 분리 등을 당업자의 통상의 능력 범위에 속할 것이다.

<38> 또한 상기에서 그리고 청구범위를 포함하는 이하에서, "서열번호 2에 기재된 아미노산 서열의 실질적인 부분"은 본 출원시를 기준으로 당업계에 공지된 방법을 통하여 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드와 비교하였을 때 활성은 떨어지더라도 여전히 그 기능, 즉 피리독신 생합성 관련 기능을 보유한다고 보기에 충분한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드로 정의된다. 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드에서 N-말단 부분 또는 C-말단 부분은 제거되더라도, 그러한 것들은 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드와 비교해서 활성은 떨어지더라도, 여전히 그 기능, 즉 피리독신 생합성 관련 기능을 보유할 것으로 기대할 수 있다. 특히 본 발명에서 서열번호 18번에서 226번 아미노산 서열 부위는 SOR/SNZ 패밀리(이러한 패밀리에 속하는 효소들은 피리독신/피리독살 5-인산 생합성에 관여하는 효소로 알려져 있다) 도메인으로 확인되었기 때문에, 서열번호 18번의 상위(upstream) 부분 및/또는 서열번호 226번의 하위(downstream) 부분에서 하나 이상의 아미노산이 결실되더라도, 그 결실된 폴리펩티드는 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드 보다는 활성은 낮을 지라도, 여전히 위 폴리펩티드가 가지는 기능을 보유할 것이다. 그렇다고 하여, 상기 "서열번호 2에 기재된 아미노산 서열의 실질적인 부분"이 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드에서 SOR/SNZ 패밀리 도메인 부분, 즉, 서열

번호 18번에서 226번 아미노산 서열 부분에서 하나 이상의 아미노산이 결실된 폴리펩티드를 포함하지 않는 것은 아니다. 그것은 SOR/SNZ 패밀리 도메인 부분에서 하나 이상의 아미노산이 결실되더라도 여전히 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드의 기능, 즉 피리독신 생합성 관련 기능을 보유할 수 있기 때문이다. 이러한 도메인에서 결실되는 아미노산(들)은 이들 패밀리에 속하는 효소들의 아미노산 서열, 특히 위 도메인 부분들을 다중 서열 정렬(multiple sequence alignment) 방식의 비교를 통하여 알아낼 수 있다. 따라서 위 "서열번호 2에 기재된 아미노산 서열의 실질적인 부분"이란 서열번호 2로 이루어진 폴리펩티드에서 하나 이상의 아미노산이 결실된 폴리펩티드로서, 활성은 떨어지더라도 여전히 그 폴리펩티드의 기능, 즉 피리독신 생합성 관련 기능을 보유하는 모든 폴리펩티드를 포함하는 것으로서 이해되어야 한다. 이와 관련하여, 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열의 실질적인 부분은 SOR/SNZ 패밀리 도메인의 일부분인 것이 바람직하며, SOR/SNZ 패밀리 도메인인 것이 더욱 바람직하다. 한편, 여기서 피리독신 생합성 관련 기능을 여전히 보유하는 서열번호 2의 아미노산 서열의 실질적인 부분을 얻는 방법은 본 명세서의 기재 내용 및 당업계에 공지된 기술에 기초하는 한 당업자의 통상의 능력 범위 내에 속할 것이며, 또한 상기 실질적인 부분이 본래의 폴리펩티드가 갖는 기능 즉, 생합성 합성 관련 기능을 여전히 가지는가의 테스트 방법도 마찬가지 이유에서 당업자의 통상의 능력 범위내에 속할 것이다.

<39> 또한 상기에서 그리고 청구범위를 포함하는 이하에서, "서열번호 2에 기재된 아미노산 서열 전체를 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드와 실질적으로 유사한 단

리된 폴리뉴클레오티드" 및 "서열번호 2에 기재된 아미노산 서열의 실질적인 부분을 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드와 실질적으로 유사한 단리된 폴리뉴클레오티드"란 그로부터 발현되는 폴리펩티드가 하나 이상의 치환된 아미노산을 포함하지만, 본래의 폴리펩티드가 가지는 기능, 즉 피리독신 생합성 관련 기능을 여전히 보유하는 폴리펩티드를 코딩하는, 하나 이상의 치환된 뉴클레오티드(변형된 뉴클레오티드를 포함한다)를 포함하는 폴리뉴클레오티드를 말한다. 여기서 피리독신 생합성 관련 기능을 여전히 보유하는 폴리펩티드는 그것이 가지는 활성이 본래의 폴리펩티드가 가지는 활성, 즉, 서열번호 2의 아미노산으로 이루어진 폴리펩티드가 가지는 활성보다 낮더라도 그러한 활성을 보유하는 모든 폴리펩티드를 포함한다. 하나 이상의 뉴클레오티드가 치환되어 하나 이상의 아미노산 치환의 유발되더라도, 치환되기 전 아미노산이 치환된 아미노산과 화학적으로 등가라면, 그러한 치환된 하나 이상의 뉴클레오티드를 포함하는 폴리뉴클레오티드로부터 발현된 폴리펩티드는 여전히 본래의 폴리펩티드의 기능을 보유할 것이다. 예컨대, 소수성 아미노산인 알라닌에 대한 코돈은 다른 소수성의 아미노산, 예를 들면 글리신, 또는 보다 더 소수성인 아미노산, 예를 들면 발린, 류신 또는 이소류신을 코딩하는 코돈에 의해 치환되더라도 그러한 치환된 아미노산(들)을 가지는 폴리펩티드는 활성은 낮더라도 본래의 폴리펩티드가 가지는 기능을 여전히 보유할 것이다. 마찬가지로, 음으로 하전 된 아미노산 예컨대, 글루탐산을 코딩하는 코돈이 다른 음으로 하전 된 아미노산, 예컨대 아스파르산을 코딩하는 코돈으로 치환되더라도 그러한 치환된 아미노산(들)을 가지는 폴리펩티드도 활성은 낮더라도 본래의 폴리펩티드가 가지는 기

능을 여전히 보유할 것이며, 또한 양으로 하전 된 아미노산, 예컨대 아르기닌을 코딩하는 코돈이 다른 양으로 하전 된 아미노산, 예컨대, 리신을 코딩하는 코돈으로 치환되더라도 그러한 치환된 아미노산(들)을 가지는 폴리펩티드 또한 활성은 낮더라도 본래의 폴리펩티드가 가지는 기능을 여전히 보유할 것이다. 또한 폴리펩티드의 N-말단 또는 C-말단 부분에서 치환된 아미노산(들)을 포함하는 폴리펩티드는 본래의 폴리펩티드가 가지는 기능을 여전히 보유할 것이다. 특히 본 발명에 있어서는 서열번호 2의 서열번호 18번에서 226번 아미노산 서열 부위는 SOR/SNZ 패밀리 도메인으로 확인되었기 때문에, 서열번호 18번의 상위(upstream) 부분 및/또는 서열번호 226번의 하위(downstream) 부분에서 하나 이상의 아미노산이 치환되더라도, 그 치환된 아미노산을 포함하는 폴리펩티드는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드 보다는 활성은 낮을 지라도, 여전히 위 폴리펩티드가 가지는 기능을 보유할 것이다. 나아가 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드에서 SOR/SNZ 패밀리 도메인 부분, 즉 서열번호 18번에서 226번 아미노산 서열 부분에서 하나 이상의 아미노산이 치환된 폴리펩티드도 여전히 본래의 폴리펩티드 즉 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드가 가지는 기능, 즉 피리독신 생합성 관련 기능을 가질 수 있다. 그것은 SOR/SNZ 패밀리 도메인 부분에서 하나 이상의 아미노산이 치환되더라도 여전히 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드의 기능 즉 피리독신 생합성 관련 기능을 가질 수 있기 때문이다. 특히, 이 경우 이러한 도메인에서 치환되는 아미노산(들)은 이러한 패밀리에 속하는 효소들의 아미노산 서열(특히 위 도메인 부분)들을 다중 서열 정렬 방식의 비교를 통하여 알아

낼 수 있는 이점이 있다. 전술한 바의 치환된 아미노산(들)을 포함하더라도 본래의 폴리펩티드가 가지는 기능을 여전히 보유하는 폴리펩티드를 얻는 방법은 본 명세서의 기재 내용 및 당업계에 공지된 기술에 기초하는 한 당업자의 통상의 능력에 속할 것이며, 또한 치환된 아미노산(들)을 포함하는 폴리펩티드가 본래의 폴리펩티드와 같은 기능을 여전히 보유하는가의 테스트 방법도 마찬가지 이유에서 당업자의 통상의 능력 범위에 속할 것이다.

<40> 한편, 본 발명의 피리독신 생합성 관련 기능을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1에 표기된 염기 서열의 일부분을 포함하는 것이 바람직하다. 여기서 "서열번호 1에 표기된 염기 서열의 일부분"이란 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드의 기능, 즉, 피리독신 생합성 관련 기능을 여전히 보유하기에 충분한 길이의 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 말한다. 여기서도 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드의 기능을 보유하기만 한다면 그 활성이 본래의 폴리펩티드, 즉, 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드가 가지는 활성에 비하여 낮더라도 문제되지 않는다. 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드의 일부분, 특히 피리독신 생합성 관련 기능에 필수적인 도메인으로 알려진 SOR/SNZ 패밀리 도메인 부분, 즉 서열번호 2의 서열번호 18번에서 226번 아미노산 서열 부분을 코딩하는 서열번호 1의 해당 부분을 포함하는 폴리뉴클레오티드는 적당한 길이의 N-말단과 C-말단을 코딩하는 올리고뉴클레오티드를 포함한다면, 활성은 낮더라도 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드가 가지는 피리독신 생합성 관련 기능을 보유할 것으로

기대된다. 또한 서열번호 1에서 N-말단 부분 또는 C-말단 부분을 코딩하는 부분이 제거되더라도 그러한 서열번호 1의 일부분에서 발현된 폴리뉴클레오티드도 마찬가지로 활성은 낫더라도 피리독신 생합성 관련 기능을 보유할 것이다. 서열번호 1의 염기 서열에서 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드의 기능을 여전히 보유하기에 충분한 길이의 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 얻는 방법은, 본 발명이 개시하는 서열번호 1의 염기 서열, 서열번호 2의 아미노산 서열 및 기타 본 명세서의 기재 및 당업계에 공지된 기술에 기초하는 한 당업자의 통상의 능력 범위 내에 속할 것이고, 또 그러한 폴리뉴클레오티드가 암호화하는 폴리펩티드가 서열번호 2의 아미노산로 이루어진 폴리펩티드와 같은 기능을 갖는가의 테스트 방법도 마찬가지로 당업자의 통상의 능력 범위 내에 속할 것이다. 그러므로 서열번호 1에서 기타의 부분이 제거되더라도 그로부터 발현되는 폴리펩티드가 피리독신 생합성 관련 기능을 갖는다면, 그러한 기능을 갖는 폴리펩티드를 얻는 방법이 당업자의 통상의 능력 범위 내에 속하는 한, 그러한 서열번호 1의 일부분은 모두 본 발명에 포함되는 것으로 이해되어 할 것이다.

<41> 또한, 본 발명의 피리독신 생합성 관련 기능을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1에 표기된 염기 서열 전체를 포함하는 것이 가장 바람직하다. 서열번호 1에 표기된 염기 서열 전체를 포함하는 폴리뉴클레오티드에서 발현되는 폴리펩티드가 가장 높은 피리독신 생합성 관련 기능을 가질 것으로 기대 되기 때문이다.

<42> 한편, 본 발명의 피리독신 생합성 관련 기능을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 다른 방식으로 정의하는 것이 가능하다.

<43> 본 발명의 피리독신 생합성 관련 기능을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 다른 방식으로 정의되는 경우, 그러한 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열과 62 % 이상의 상동성을 지니면서 피리독신 생합성 관련 기능을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드로서 정의될 수 있다. 본 발명자들이 얘기장대에서 실제로 분리해낸 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드는, 도 1 및 본 명세서의 관련 설명에서 확인되는 바와 같이, SOR/SNZ 패밀리를 함유한 정지기 유도 단백질인 KOG1606 패밀리에 속하는 단백질들, 즉 얘기장대의 에틸렌 유도 단백질 관련 단백질(ethylene-inducible protein-related protein; Genebank accession number NP188226) 및 얘기장대의 세르코스포라 니코티아네의 SOR 1 관련 단백질(SOR1 from the fungus *Cercospora nicotianae*-related protein from *Arabidopsis thaliana*; Genebank accession number NP181358)의 아미노산 서열과 각각 62%, 89%의 상동성을 지니고 있었으며, 또한 사카로마이세스 세레비제(*Saccharomyces cerevisiae*)의 SNZ1, SNZ2, SNZ3 단백질들(각각 Genebank accession number Q03148, P53824, P43545)의 아미노산 서열과는 각각 58%, 61%, 61%의 상동성을 지니고 있었다. 상기 얘기장대의 에틸렌 유도 단백질 관련 단백질이나 얘기장대의 세르코스포라 니코티아네의 SOR 1 관련 단백질이 피리독신 생합성에 필수적으로 관련되어 있다는 보고는 아직 없다. 그러므로 본 발명의 피리독신 생합성 관련 기능을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 서열번호 2의

아미노산 서열과 62% 이상의 상동성을 지니는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드로 정의되는 것은 전술한 바와 같이 관련 단백질들과의 서열 상동성 비교에서 비롯된 것이다. 한편, 서열번호 2의 아미노산 서열과 62 % 이상의 상동성을 지니면 서 피리독신 생합성 관련 기능을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 얻는 방법은 본 명세서의 개시 내용 및 당업계에 알려진 공지의 기술을 기초로 하는 한 당업자의 통상의 능력이 범위에 속하는 것이며, 서열번호 2의 아미노산 서열과 62% 이상의 상동성을 가지는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 피리독신 생합성 관련 기능을 보유하는 폴리펩티드를 코딩하는가에 대한 테스트 방법도 마찬가지의 이유에서 당업자의 통상의 능력이 범위에 속하는 것이다.

<44> 또한, 본 발명의 피리독신 생합성 관련 기능을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 상기와 같이 다르게 정의할 때, 그 폴리펩티드는 서열번호 2의 아미노산 서열과 63 % 이상의 상동성을 지니는 것이 바람직하며, 68 % 이상의 상동성을 지니는 것이 더욱 바람직하고, 90 % 이상의 상동성을 지니는 것이 더더욱 바람직하다. 여기서 상기 63 % 이상의 상동성으로 한정한 것은 애기장대의 에틸렌 유도 단백질 관련 단백질과 62 %의 상동성을 지닌다는 사실을 고려한 것이며, 또 상기 68 % 이상의 상동성으로 한정한 것은 서열번호 2의 아미노산 서열 중에 SOR/SNZ 도메인이 포함되어 있어 이 도메인에 해당하는 아미노산 서열 부분이 서열번호 2의 전체 아미노산 서열에서 차지하는 비율을 고려한 것이고, 상기 90 % 이상의 상동성으로 한정한 것은 애기장대의 세르코스포라 니코티아네의 SOR 1 관련 단백질과 89 % 이상의 상동성을 지닌다는 사실을 고려한 것이다.

<45> 또한 본 발명의 피리독신 생합성 관련 기능을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 상기와 같이 다르게 정의할 때, 그 폴리펩티드는 서열번호 2의 18번의 위치에서 227번의 위치까지의 아미노산 서열을 포함하는 것이 바람직하다. 그것은 서열번호 2의 18번의 위치에서 227번의 위치까지의 아미노산 서열이 서열번호 2의 아미노산 서열에서 SOR/SNZ 도메인에 해당하는 부분의 아미노산 서열이기 때문이다.

<46> 또한 상기 피리독신 생합성 관련 기능을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2의 아미노산을 포함하는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 더 바람직하다. 왜냐하면, 앞서 전술한 바와 같이 서열번호 2를 포함하는 폴리펩티드가 더 활성이 높은 피리독신 생합성 관련 기능을 가질 것으로 기대되기 때문이다.

<47> 한편, 가장 바람직하게는 상기 피리독신 생합성 관련 기능을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1의 염기서열을 포함할 때이다.

<48> 본 발명은 다른 측면에 있어서, 전술한 바의 폴리뉴클레오티드에 의하여 코딩되는 피리독신 생합성 관련 기능을 갖는 폴리펩티드에 대한 것이다.

<49> 전술한 바의 폴리뉴클레오티드는 모두, 활성의 높고 낮음의 차이는 있지만, 생활성 관련 기능을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 것이기 때문에, 전술한 바의 폴리뉴클레오티드에 의하여 코딩된다면, 그러한 폴리펩티드는 상기 본 발명의 폴리펩티드에 포함된다.

<50> 그럼에도, 그 활성의 관점에서 봤을 때, 바람직한 폴리펩티드는 SOR/SNZ 도메인 부분을 포함하는 폴리펩티드이며, 가장 바람직한 폴리펩티드는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드이다.

<51> 본 발명은 또 다른 측면에 있어서, 전술한 바의 폴리뉴클레오티드에 상보적으로 결합할 수 있는 안티센스 뉴클레오티드에 대한 것이다.

<52> 상기 안티센스 뉴클레오티드는 전술한 바의 폴리뉴클레오티드에 상보적으로 결합하여 전사(transcription)(폴리뉴클레오티드가 DNA인 경우) 또는 번역(translation)(폴리뉴클레오티드가 RNA인 경우)을 저해할 수 있는 모든 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 이러한 안티센스 뉴클레오티드는 전술한 바의 피리독신 생합성 관련 기능을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 상보적으로 결합하여 전사(transcription)(폴리뉴클레오티드가 DNA인 경우) 또는 번역(translation)(폴리뉴클레오티드가 RNA인 경우)을 저해할 수 있다면, 그 길이라든지 그 상보적인 서열 상동성을 문제되지 않는다. 짧은 길이, 예컨대 30개 뉴클레오티드 정도의 폴리뉴클레오티드라고 하더라도 그것의 해당 유전자(DNA 및 RNA 포함)에 100%의 상보적인 서열 상동성을 지니고 기타의 조건 예컨대 농도나 pH 등이 적절하게 갖추어진다면 안티센스 뉴클레오티드로서 작용할 수 있다. 또 서열에 있어서도 그것의 해당 유전자와 100%의 상보적인 서열 상동성을 지니지 않더라도 적당한 크기의 길이를 갖는다면 마찬가지로 안티센스 뉴클레오티드로서 작용할 수 있다. 그러므로 안티센스 뉴클레오티드의 길이, 상보적인 서열 상동성의 정도에 상관없이 안티센스 뉴클

레오티드로서 작용할 수 있다면, 즉 해당 유전자의 전사 또는 번역을 저해할 수 있는 능력을 보유하고 있다면, 모두 본 발명의 안티센스 뉴클레오티드에 포함되는 것으로 간주되어야 한다. 여기서 안티센스 뉴클레오티드로서 필요한 길이의 결정, 해당 유전자와 상보적인 서열 상동성의 정도, 그리고 그러한 안티센스 뉴클레오티드의 제조 방법 등은 본 명세서의 기재 내용 및 당업계에 공지된 기술에 기초하는 한 모두 당업자의 통상의 능력 범위내에 속할 것이다.

<53> 한편, 바람직하게는, 상기 안티센스 뉴클레오티드는 서열번호 1의 염기서열의 일부분에 상보적인 부분을 포함하는 안티센스 뉴클레오티드가 바람직할 것이다. 여기서 "서열번호 1의 염기서열의 일부분에 상보적인 부분"이란 이미 전술한 바를 고려한다면, 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 DNA 또는 그것으로부터 전사된 RNA 와 상보적으로 결합하여 그 전사 또는 번역을 방해하기 충분한 길이를 포함하는 것으로 이해될 수 있다.

<54> 본 발명은 또 다른 측면에 있어, 전술한 바의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 백터 및 이러한 재조합 백터로 형질전환된 형질전환체에 대한 것이다.

<55> 하기 본 발명의 실시예에서는, 서열번호 1에 기재된 염기서열로 이루어진 피리독신 생합성 관련 기능을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 pCAL-n(Stratagene, USA)에 삽입하여 제작된 재조합 백터를 pCAtPDX4로 명명하고, 이러한 pCAtPDX4 재조합 백터를 대장균에 형질 전환시킨 후, 위 폴리뉴클레오티드로부터 발현된 폴리펩티드를 분리해내고, 그 분자량을 확인한 결과, 서열번호 1의 염기

서열의 전사 해독 틀(ORF)로부터 추정된 문자량과 동일함을 확인할 수 있었다.

<56> 그러므로 상기 재조합 벡터는 pCAtPDX4인 것이 바람직할 것이고, 또한 본 발명의 형질전환체는 상기 재조합 벡터로 형질전환된 대장균인 것이 바람직할 것이다.

<57> 본 발명은 또 다른 측면에 있어서, 식물의 생장을 억제하는 방법을 제공한다. 구체적으로 본 발명의 식물의 생장을 억제하는 방법은 서열번호 2의 아미노산 서열 또는 그와 유사한 서열로 이루어진 피리독신 생합성 관련 기능을 가지는 폴리펩티드의 발현 또는 기능을 억제하는 단계를 포함함을 특징으로 한다.

<58> 전술하였지만, 피리독신은 식물 및 동물의 생장에 필수적인 비타민이다. 인간을 포함한 동물은 피리독신 생합성 능력이 결여된 반면, 식물은 피리독신 생합성을 보유하고 있다. 이처럼 식물의 생장에 필수적인 비타민인 피리독신의 생합성을 저해시킨다면 인간에게 해를 주지 않으면서 식물의 생장을 억제시키는 것이 가능해진다. 따라서 상기 본 발명의 식물의 생장을 억제하는 방법은 피리독신의 생합성에 필수적으로 관여된 것으로 알려진 폴리펩티드의 발현 또는 기능을 억제함으로써 가능해지는 것이다.

<59> 한편, 상기에서 그리고 청구범위를 포함하는 이하에서, "서열번호 2의 아미노산 서열과 유사한 서열로 이루어진 폴리펩티드"란 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드의 동족체로서 피리독신 생합성 관련 기능을 지니면서, 식물체의 종류에 따른 진화적 경로의 상이로 인하여 서열번호 2의 아미노산 서열과 달라

지는 서열로 이루어진 모든 폴리펩티드를 포함하는 의미이다. 그러므로 상기 본 발명의 식물의 생장을 억제하는 방법에 있어서, 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드가 비록 애기장대에서 분리된 것이라 하더라도, 상기 식물의 범위에는 애기장대뿐만 아니라 기타의 모든 식물이 포함되는 것으로 이해되어야 한다.

<60> 한편, 상기에서 폴리펩티드의 발현 억제는 당업계에 공지된 방법으로 충분히 가능하다. 즉, 안티센스 뉴클레오티드 도입, 유전자 제거(gene deletion), 유전자 삽입(gene insertion), T-DNA 도입, 동종 재조합(homologous recombination) 또는 트랜스포전 태깅(transposon tagging), siRNA (small interfering RNA) 등의 방법이 이용될 수 있다.

<61> 하기 본 발명의 실시예에서는 안티센스 뉴클레오티드를 식물체내에 도입하는 방법을 이용하였는데, 구체적으로는, 먼저 서열번호 1의 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오티드에 대한 안티센스 뉴클레오티드를 제조한 다음 이를 포함하는 재조합 벡터(pSEN-AtPDX4 벡터)를 제작하고, 그 재조합 벡터를 아그로박테리움 튜퍼파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens*)에 형질전환시킨 후 이 형질전환체를 애기장대에 형질전환시키는 과정을 거쳤다. 그 형질전환된 애기장대의 종자나 그 종자를 육종하여 얻어진 종자 모두 생육이 현저히 저하되고 심지어는 치사됨을 확인할 수 있었다(하기 실시예 3 참조).

<62> 그러므로 본 발명의 식물의 생장을 억제하는 방법에 있어, 상기 단계는 서열 번호 1의 염기서열의 일부분에 상보적인 부분을 포함하는 안티센스 뉴클레오티드를

해당 식물체내에 도입하는 단계를 포함하는 것이 바람직할 것이고, 상기 안티센스 뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체를 식물체내로 도입하는 단계를 포함하는 것이 더욱 바람직할 것이고, 특히 위 재조합 벡터로 형질전환된 아그로박테리움 투미파시엔스를 식물체내에 도입하는 단계를 포함하는 것이 더더욱 바람직할 것이다. 여기서 "서열번호 1의 염기서열의 일부분에 상보적인 부분"이란 상기 본 발명의 안티센스 뉴클레오티드와 관련하여 설명한 바와 같다.

<63> 일반적으로 안티센스 뉴클레오티드는 핵산(RNA 또는 DNA)내 표적 뉴클레오티드 배열과 결합하여, 상기 핵산의 기능 또는 합성을 억제하는 역할을 한다고 알려져 있다. 즉, 어떤 특정한 유전자에 상응하는 안티센스 뉴클레오티드는 RNA 및 DNA 양자 모두에 혼성화하는 능력을 지님으로써, 전사(transcription) 또는 번역(translation) 과정에서 특정 유전자의 발현을 저해하는 것이다.

<64> 상기와 같이, 서열번호 2의 아미노산 서열 또는 그와 유사한 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드의 발현 억제나 그 기능 억제를 통하여 피리독신 생합성이 저해되면 식물의 생장이 억제될 수 있다.

<65> 본 발명은 또 다른 측면에 있어서, 식물의 생장을 억제하는 물질의 스크리닝 방법에 대한 것이다. 상기 방법은 서열번호 2의 아미노산 서열 및 그와 유사한 서열로 이루어진 피리독신 생합성 관련 기능을 가지는 폴리펩티드의 발현 또는 그 기능을 억제하는 물질을 검출하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.

<66> 상기에서 그리고 청구범위를 포함하는 이하에서, 서열번호 2의 아미노산 서

열과 유사한 서열로 이루어진 폴리펩티드란 상기 본 발명의 식물의 생장을 억제하는 방법에서 설명한 바가 그대로 적용되어질 것이고, 위 폴리펩티드의 발현을 억제하는 물질로서는 그리고 이미 전술한 바 있는 피리독신 생합성 관련 기능을 가지는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 대한 안티센스 뉴클레오티드를 들 수 있을 것이다.

<67> 한편, 상기 물질은 본 발명의 식물의 생장을 억제하는 방법과 관련하여 이미 설명한 바의 이유에서 서열번호 1의 염기서열의 일부분에 상보적인 부분을 포함하는 안티센스 뉴클레오티드인 것이 바람직할 것이고, 상기 안티센스 뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체인 것이 더욱 바람직할 것이며, 특히 위 재조합 벡터로 형질전환된 아그로박테리움 튜퍼파시엔스인 것이 더욱 바람직할 것이다. 여기서도 "서열번호 1의 염기서열의 일부분에 상보적인 부분"이란 상기 본 발명의 안티센스 뉴클레오티드와 관련하여 설명한 바와 같다.

<68> 본 발명의 또 다른 목적은 상기 스크리닝 방법을 통하여 얻어진 물질을 포함하는 식물의 생장 억제용 조성물에 대한 것이다.

<69> 이러한 식물의 생장 억제용 조성물은 인간 및 동물에 해를 주지 않으면서 식물의 생장을 억제하는 효과를 지닐 것으로 기대된다. 그것은 본 발명의 식물의 생장 억제용 조성물이 인체에 무해하고 환경친화적인 제초제로서 이용될 수 있음을 시사하는 것이라 할 수 있다.

<70> 한편, 상기에서 상기 스크리닝 방법을 통하여 얻어진 물질은 앞서 전술한 바

의 안티센스 뉴클레오티드인 것이 바람직하고, 특히 서열번호 1의 염기서열의 일부분에 상보적인 부분을 포함하는 안티센스 뉴클레오티드인 것이 바람직할 것이다. 또한 상기 물질은 상기 안티센스 뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체인 것이 더욱 바람직할 것이며, 또한 그 형질전환체는 위 재조합 벡터로 형질전환된 아그로박테리움 투미파시엔스인 것이 바람직할 것이다. 여기서도 "서열번호 1의 염기서열의 일부분에 상보적인 부분"이란 상기 본 발명의 안티센스 뉴클레오티드와 관련하여 설명한 바와 같다.

<71> 이하, 본 발명을 실시예를 참조하여 설명한다. 그러나 이러한 실시예가 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니다.

#### <실시예 1> 애기장대로부터 피리독신 생합성 관련 기능을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자의 분리

<73> 피리독신 생합성 관련 기능을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자를 애기장대로부터 분리하기 위한 스크리닝을 수행하였다.

##### 1-1) 애기장대의 재배 및 배양

<75> 애기장대는 토양을 담은 화분에서 재배하거나, 2% 수크로즈(sucrose, pH 5.7)와 0.8% 아가(agar)가 포함된 MS(Murashige and Skoog salts, Sigma, USA) 배지를 넣은 페트리 디쉬에서 재배하였다. 본 연구에서 사용한 모든 MS 배지는 비타민 혼합물(mixture) 중 B6군(피리독신 등)이 배제된 상태이다. 화분에서 재배할 때

는 22°C의 온도에서 16/8시간 명암 주기로 조절되는 생장 조절기(growth chamber)내에서 재배하였다.

<76> 1-2) RNA 추출과 cDNA 라이브러리의 제조

<77> 애기장대 cDNA 라이브러리를 만들기 위해서 여러 분화단계의 애기장대 잎으로부터 TRI 시약(Sigma, USA)을 사용하여 RNA를 추출하였고, 추출된 전체 RNA로부터 mRNA 분리 키트(Pharmacia, USA)의 프로토콜에 따라 poly(A)+ RNA를 분리하였다. 프라이머(primer)로 *NotI-(dT)<sub>18</sub>*을 이용하여 poly(A)+ RNA와 cDNA 합성 키트(Time Saver cDNA synthesis kit, Pharmacia, USA)로 이중 가닥의 cDNA를 제조하였다.

<78> 1-3) 피리독신 생합성 관련 기능을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자 분리

<79> 애기장대의 피리독신 생합성과 관련되어 있다고 추정되는 단백질(GeneBank accession number NP 195761)의 아미노산 서열을 기초로 하여 서열번호 3으로 표시되고, 제한효소 *Bg*II의 서열이 포함된 정방향 프라이머와 서열번호 4로 표시되고, 제한효소 *Hind*III의 서열이 포함된 역방향 프라이머를 합성하였다. 상기 두 프라이머를 사용하여 상기 실시예 1-2)에서 제조된 애기장대 cDNA 라이브러리로부터 PCR(polymerase chain reaction)을 이용하여 전장 cDNA를 증폭하고 분리하였다.

<80> 상기 분리된 cDNA의 분석 결과, 약 33.2kDa의 분자량을 갖는 309개의 아미노산을 코딩하는 930bp 크기의 전사 해독 틀(ORF)을 가지고 있으며, 하나의 엑손

(exon)으로 구성되어 있음을 확인하였고, 이를 *AtPDX4*(*Arabidopsis thaliana* pyridoxine biosynthesis protein 4)로 명명하였다.

<81> 한편, 상기 *AtPDX4*로부터 추정되는 아미노산 서열 중 18번 - 226번 아미노산 서열 부위에 SOR/SNZ 패밀리 도메인을 포함하고 있어 본 발명의 폴리뉴클레오티드가 피리독신 생합성 경로에 관여할 뿐만 아니라 활성산소에 대한 방어 기작을 조절하는 기능을 포함할 수 있음을 추정할 수 있었다. 이러한 사실은 본 유전자의 과발현(over-expression)이 식물체의 다양한 스트레스, 특히 활성 산소에 대한 방어 기작을 제공할 수 있으리라 추측되며, 이러한 제안에 대한 연구는 추후 진행될 예정이다. 또한, 모티프(motif)에 대한 최근 연구에 따르면, 본 유전자의 아미노산 서열 대부분은 SOR/SNZ 패밀리를 함유한 정지기 유도 단백질인 KOG1606 패밀리를 함유하고 있다. 이러한 패밀리에 속한 단백질들의 아미노산 서열을 상기 *AtPDX4*로부터 추정되는 아미노산 서열과 다중 서열 정열 방식을 통하여 비교해 본 결과를 도 1에 도시하였다. 도 1에서 At5g10410은 애기장대 *AtPDX4* 단백질을, At3g16050은 애기장대의 에틸렌 유도 단백질 관련 단백질(GeneBank accession number NP\_188226)을, At2g28230은 애기장대의 세르코스포라 니코티아네의 SOR 1 관련 단백질(GeneBank accession number NP181358)을, SNZ1, SNZ2 및 SNZ3 단백질은 사카로마이세스 세레비제(*Saccharomyces cerevisiae*)의 SNZ1, SNZ2 및 SNZ3 단백질(각각 GeneBank accession number Q03148, P53824, P43545)을 가리킨다. 또한 도 1에서 아미노산 서열이 동일한 부분은 "\*"로, 보존 치환(conserved substitution) 부분은 ":"로, 그리고 반 보존 치환(semi-conserved substitution) 부분은 "."로 표시하였

다. 한편 위 단백질들의 아미노산 서열의 상동성을 비교한 결과, *AtPDX4* 아미노산 서열은 애기장대의 에틸렌 유도 단백질 관련 단백질, 애기장대의 세르코스포라 니코티아네의 SOR 1 관련 단백질과 각각 62%, 89%의 상동성을 지니고 있었으며, 또한 사카로마이세스 세레비제의 SNZ1, SNZ2, SNZ3 단백질들과는 각각 58%, 61%, 61%의 동일성을 지니고 있음을 확인하였다. 모티프 분석 결과, *AtPDX4* 유전자는 진핵 생물의 *Pdx1*과 *Pdx2*, 둘 다와 상동성(homology)이 높음을 보여주고 있으며, 이중 어느 유전자와 유사한 기능을 가지는 가에 대한 결과는 유전자의 기능에 대한 보다 많은 연구를 통해 밝혀질 것이다.

<82> <실시예 2> 대장균에서 *AtPDX4* 유전자로부터 발현되는 단백질의 정제

<83> 2-1) 단백질의 발현 유도

<84> 상기 실시예 1-3)에서 분리한 *AtPDX4* cDNA 전장 부위를 포함한 증폭된 DNA 단편(fragment)을 *Bgl*II 제한효소와 *Hind*III 제한효소로 절단하였으며, pCAL-n 벡터 (Stratagene, USA)의 *Bam*H1 제한 효소 부위(*Bgl*II compatible end ligation 부위)와 *Hind*III 제한효소 부위에 클로닝하여 pCAtPDX4 재조합 벡터를 제작하였다. 여기서 상기 pCAL-n 벡터는 칼모듈린-결합 펩티드 표지(calmodulin-binding peptide tag) 서열을 포함하고 있기 때문에 상기 벡터로부터 발현되는 단백질은 칼모듈린 레진(calmodulin resin)에 의해 쉽게 분리될 수 있다는 이점이 있다.

<85> 상기 pCAtPDX4 재조합 벡터를 대장균 BL21-Gold(DE3)(Stratagene, USA)에 형질전환시킨 후, 100 $\mu$ g/ml의 암피실린(ampicillin)이 포함된 LB(Luria-Bertani

broth, USB, USA) 배지에서 O.D.600 값이 0.7이 될 때까지 37°C에서 150rpm으로 교반 배양하였다. 목표 단백질의 대장균 세포내 발현을 유도하기 위하여, 상기 혼탁액에 IPTG(isopropyl-D-thiogalactoside)를 최종 농도 1mM이 되도록 첨가한 후에 2시간 더 재배하였다. 재배된 세포를 50mM MgSO<sub>4</sub>와 0.4M NaCl이 용존된 50mM-포타슘 포스페이트 버퍼(potassium phosphate buffer, pH 7.0)로 세척한 후, 다시 4,000xg에서 15분 동안 원심분리 하였고, 침전물을 모아 -20°C에서 보관하였다.

<86> 상기 단백질의 발현을 확인하기 위하여 pCAtPDX4 재조합 백터로 형질전환된 대장균에서 분리한 용출액을 대상으로 SDS-PAGE를 수행하였다. 그 결과, 도 2에 도시한 바와 같이, pCAtPDX4 재조합 백터로 형질전환된 대장균에서 분리한 용출액이 약 37kDa 크기의 융합 단백질( *AtPDX4* 유전자로부터 발현되는 단백질의 분자량 33.2kDa + 칼모듈린 결합 웨티드의 분자량 4kDa)을 포함하고 있음을 확인할 수 있었다. 반면, 대조군 대장균의 용출액에서는 상기 크기의 단백질을 포함하고 있지 않음을 확인할 수 있었다. 도 2에서 화살표(←)는 37kDa 크기의 융합 단백질 (*AtPDX4* 유전자로부터 발현되는 단백질의 분자량 33.2kDa + 칼모듈린 결합 웨티드의 분자량 4kDa)을 나타낸다. 그리고 레인 1 및 3은 대조군 대장균 용출액에 대한 것이고, 레인 2는 *AtPDX4* 유전자가 포함된 재조합 백터로 형질전환된 대장균 콜로니(colony)-1의 용출액에 대한 것이며, 레인 4는 *AtPDX4* 유전자가 포함된 재조합 백터로 형질전환된 대장균 콜로니(colony)-2의 용출액에 대한 것이다.

<87> < 실시예 3 > *AtPDX4* 유전자에 대한 안티센스 구성체(construct)가 도입된 형질전환 애기장대의 제조 및 특성 분석

<88> 3-1) *AtPDX4* 유전자에 대한 안티센스 구성체가 도입된 형질전환 애기장대의 제조

<89> 상기 실시예 2-1)에서 분리한 단백질의 생리학적 특성을 확인하기 위하여 *AtPDX4* 유전자가 안티센스방향으로 도입된 형질전환 애기장대를 제조하여 *AtPDX4* 전사체 발현을 억제하였다.

<90> 서열번호 5로 표시되고, 제한효소 *Bgl* II의 서열이 포함된 정방향 프라이머 및 서열번호 6으로 표시되고, 제한효소 *Xba*I의 서열이 포함된 역방향 프라이머를 이용하여 애기장대의 cDNA로부터 PCR을 이용하여 *AtPDX4* cDNA를 안티센스 방향으로 증폭하였다. 상기 DNA를 제한효소 *Bgl* II과 *Xba*I으로 절단하고, 발아시기에 식물체의 치사를 피하기 위하여 스트레스 또는 노화 관련 유전자인 *sen1* 프로모터의 조절을 받도록 제작한 pSEN 벡터에 클로닝하여 *AtPDX4* 유전자에 대한 안티센스 구성체인 pSEN-*AtPDX4* 재조합 벡터를 제작하였다. 상기에서 *sen1* 프로모터는 식물의 생장 단계에 따라 발현되는 유전자에 대해 특이성을 갖는다. 한편, 도 3에 pSEN 벡터와 pSEN-*AtPDX4* 재조합 벡터의 구성이 도시되어 있다. 도 3에서 (a)에 도시된 것은 pSEN 벡터의 구성이고, (b)에 도시된 것은 pSEN-*AtPDX4* 재조합 벡터의 구성이다. 도 3에서 BAR는 바스타 제초제에 대한 저항성을 부여하는 *bar* 유전자 (phosphinothricin acetyltransferase gene)를 가리키고, RB는 오른쪽 경계(Right Border), LB는 왼쪽 경계(Left Border), P35S는 CaMV 35S RNA의 프로모터, 35S

poly A는 CaMV 35S RNA poly A, PSEN은 *sen1* 프로모터, Nos polyA는 노파린 합성 유전자(nopaline synthase gene)의 polyA를 가리킨다.

<91> 상기 pSEN-AtPDX4 재조합 벡터를 아그로박테리움 튜미파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens*)에 일렉트로포레이션(electroporation)방법을 이용하여 도입시켰다. 형질전환된 아그로박테리움 배양액을 28°C에서 O.D.<sub>600</sub> 값이 1.0이 될 때까지 배양하였고, 25°C에서 5,000rpm으로 10분 동안 원심분리하여 세포를 수확하였다. 수확된 세포를 최종 O.D.<sub>600</sub> 값이 2.0이 될 때까지 Infiltration Medium(IM; 1X MS SALTS, 1X B5 vitamin, 5% sucrose, 0.005% Silwet L-77, Lehle Seed, USA) 배지에 헌탁하였다. 4주된 애기장대를 진공 챔버(vacuum chamber)에 있는 아그로박테리움 헌탁액에 침지시키고, 10분 동안 10<sup>4</sup> Pa의 진공하에 두었다. 침지 후, 애기장대를 24시간 동안 폴리에틸렌 백(polyethylene bag)에 두었다. 이후, 형질전환된 애기장대를 계속 생장시켜 종자(T1)를 수확하였다. 대조군으로는 형질전환되지 않은 야생형(wild type) 애기장대 및 안티센스 AtPDX4 유전자가 포함되지 않은 벡터(pSEN 벡터)만으로 형질전환된 애기장대를 사용하였다.

<92> 3-2) T1 및 T2 형질전환 애기장대의 특성 분석

<93> 상기 실시예 3-1)에서와 같이 형질전환한 애기장대에서 수확한 종자는 0.1% 바스타(Basta) 제초제(경농, 한국) 용액에서 30분 동안 침지시키고 배양함으로써 선별하였다. 이후 형질전환한 애기장대의 생육 동안 상기 화분에 바스타 제초제를

5회 처리한 후, 각 화분에서의 애기장대 생장 양상을 조사하였다. 형질전환된 애기장대는 대조군(안티센스 *AtPDX4* 유전자가 포함되지 않은 벡터(pSEN 벡터)만으로 형질전환된 애기장대)과 비교하여 볼 때, 심하게 생장이 억제되었으며, 잎의 주맥에서 잎 끝으로 둑글게 황화 현상이 유발됨을 볼 수 있었다(도 4 참조). 또한, 본 유전자에 대한 강력한 안티센스 효과는 형질전환체의 심각한 생장 억제 및 황화 현상뿐만 아니라 형질전환체의 치사까지도 유도하였다.

<94> 한편, *AtPDX4* 유전자에 대한 안티센스 구성체(construct)로 형질전환 식물이 피리독신 영양소 요구 돌연변이체인지를 확인하기 위하여 T1 형질전환 애기장대로부터 T2 형질전환 종자를 받아 이들의 생육이 피리독신의 첨가에 의해 어떻게 반응하는지 알아보았다. 우선, T2 형질전환 애기장대를 선별하기 위하여 12.5 mg/L PPT(phosphinothricin, Duchefa, Netherlands)를 MS 배지에 넣고, 3일 동안 저온 처리(4°C)한 120개의 T2 형질전환 종자를 2.5 mg/L 피리독신-HCl(pyridoxine-HCl)(Sigma, USA)이 첨가되거나 첨가되지 않은 MS 배지를 포함하는 각각 2개(총 4개)의 페트리 디쉬(30 종자/페트리 디쉬)에서 재배하였다.

<95> 그 결과, 7일 동안 피리독신이 첨가된 페트리 디쉬에서 재배한 경우, 22개의 개체가 생장하였고, 야생형 애기장대와 비교해 볼 때 큰 표현형의 변화가 관찰되지 않았다. 반면, 피리독신이 첨가되지 않은 페트리 디쉬에서 재배한 경우, 17개의 개체만이 성장하였고, 이를 대부분은 심각한 생장 지체 현상, 잎 전체에 걸쳐 일어난 황화 현상이 발생하였다. 또한 피리독신이 첨가된 경우보다 치사 현상이 5개체나 더 많음을 보여주었다(도 5a 및 도 5b 참조). 한편, 19일 동안 피리독신이 첨가된

페트리 디쉬에서 재배한 경우, 24개의 개체가 생장하였고, 야생형 애기장대와 비교해 볼 때 약간의 황화 현상을 유발하였지만 생장 지연 등, 큰 표현형의 변화는 관찰되지 않았다. 형질전환 식물체에서 부분적인 황화 현상이 유발되는 것은 배지에 첨가한 피리독신의 함량이 부족하기 때문으로 추측된다. 반면, 피리독신이 첨가되지 않은 페트리 디쉬에서 재배한 경우, 19개의 개체만이 성장하였고, 이들 대부분은 심각한 생장 지체 현상, 잎 전체에 걸쳐 일어난 황화 현상이 발생하였다. 또한 피리독신이 첨가된 경우보다 치사 현상이 5개체나 더 많음을 보여주었다(도 5c 및 도 5d 참조). 상기의 결과에서 피리독신이 첨가된 배지에서 일어난 치사 표현형 개체 수는 1 copy에 대한 안티센스 라인의 정상적인 분리비(mutant:wild type = 3:1)에 기인하는 것이다. 이러한 결과로 보아 T2 형질전환 애기장대의 표현형의 특징은 심각한 생장 억제, 잎 전체에 걸친 황화현상, 그리고 형질전환 애기장대의 치사 유도로 들 수 있으며, 형질전환 애기장대는 피리독신 처리에 의하여 표현형이 회복됨을 알 수 있었다. 따라서, 상기 *AtPDX4* 유전자에 대한 안티센스 구성체(construct)로 형질전환된 식물체가 피리독신 영양소 요구 돌연변이체임을 확인할 수 있었다.

<96> 또한, *AtPDX4* 유전자에 대한 안티센스 구성체(construct)로 형질전환된 형질전환 식물이 피리독신 외에 다른 비타민 B6군에 의하여 표현형 회복이 유도되는지를 확인하기 위하여 T2 형질전환 애기장대의 생육이 피리독사민, 피리독살, 피리독살-5-인산의 첨가에 의해 어떻게 반응하는지 알아보았다. 우선, T2 형질전환 애기장대를 선별하기 위하여 12.5 mg/L PPT(phosphinothricin, Duchefa, Netherlands)

를 MS 배지에 넣고, 3일 동안 저온 처리(4°C)한 30개의 T2 형질전환 종자를 0.5 mg/L 농도의 피리독신-HCl(Sigma, USA), 피리독사민-2HCl(pyridoxamine-2HCl)(Sigma, USA), 피리독살-HCl(pyridoxal-HCl)(Sigma, USA), 혹은 피리독살-5-인산(Sigma, USA)이 각각 첨가되거나 첨가되지 않은 MS 배지를 포함하는 페트리 디쉬에서 재배하였다.

<97> 그 결과, 7일 동안 피리독신이 첨가된 페트리 디쉬에서 재배한 경우, 26개의 개체가 생장하였고, 야생형 애기장대와 비교해 볼 때 큰 표현형의 변화가 관찰되지 않았다. 반면, 피리독신이 첨가되지 않은 페트리 디쉬에서 재배한 경우, 21개의 개체만이 성장하였고, 이들 대부분은 생장 지체 현상 및 잎 전체에 걸쳐 일어난 황화 현상이 발생하였다. 그리고 다른 비타민 B6군이 첨가된 페트리 디쉬에서 재배한 경우, 비록 치사 형질에 대해선 어느 정도 표현형 회복이 일어났으나 전체적으로 보면 피리독신이 첨가되지 않은 배지에서 생장한 형질전환 애기장대와 유사한 표현형을 보여주었다(도 6a, 도 6b, 도 6c, 도 6d, 도 6e 참조). 따라서 상기 *AtPDX4* 유전자는 여러 비타민 B6군 중 피리독신의 생합성 경로를 직접적으로 조절하는 것으로 추측되며, 본 유전자의 폴리뉴클레오티드가 신규 제초제 개발을 위한 좋은 표적이 될 수 있음을 시사한다.

### 【발명의 효과】

<98> 전술한 바와 같이, 본 발명에 따르면, 피리독신 생합성 관련 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드에 의하여 코딩되는 피리독신 생합성 관련 기능을 갖는 폴리펩티드, 상기 폴리뉴클레오티드에 대한 안티센스 뉴

클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터, 이러한 재조합 벡터로 형질 전환된 형질전환체, 식물의 생장을 억제하는 방법, 식물의 생장을 억제하는 물질의 스크리닝 방법, 및 상기 스크리닝 방법을 통하여 얻어진 물질을 포함하는 식물의 생장 억제용 조성물을 제공할 수 있다.

## 【특허청구범위】

### 【청구항 1】

하기 (a), (b), (c) 및 (d)의 폴리뉴클레오티드들로 이루어진 군에서 선택되는, 피리독신 생합성 관련 기능을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

(a) 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열 전체를 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드;

(b) 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열의 실질적인 부분을 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드;

(c) 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열 전체를 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드와 실질적으로 유사한 단리된 폴리뉴클레오티드; 및

(d) 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열의 실질적인 부분을 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드와 실질적으로 유사한 단리된 폴리뉴클레오티드

### 【청구항 2】

제1항에 있어서,

상기 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열의 실질적인 부분은 SOR/SNZ 패밀리 도메인의 일부분인 것을 특징으로 하는, 피리독신 생합성 관련 기능을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

### 【청구항 3】

제1항에 있어서,

상기 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열의 실질적인 부분은 SOR/SNZ 패밀리 도메인인 것을 특징으로 하는, 피리독신 생합성 관련 기능을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

#### 【청구항 4】

제1항에 있어서,

상기 피리독신 생합성 관련 기능을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1에 기재된 염기서열의 일부분을 포함하는 것을 특징으로 하는, 피리독신 생합성 관련 기능을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

#### 【청구항 5】

제1항에 있어서,

상기 피리독신 생합성 관련 기능을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1에 기재된 염기서열의 전체를 포함하는 것을 특징으로 하는, 피리독신 생합성 관련 기능을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

#### 【청구항 6】

서열번호 2에 기재된 아미노산 서열과 62 % 이상의 서열 상동성을 지니면서 피리독신 생합성 관련 기능을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

#### 【청구항 7】

제6항에 있어서,

상기 폴리펩티드는 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열과 63 % 이상의 서열

상동성을 지니는 것을 특징으로 하는, 피리독신 생합성 관련 기능을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

### 【청구항 8】

제6항에 있어서,

상기 폴리펩티드는 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열과 68 % 이상의 서열 상동성을 지니는 것을 특징으로 하는, 피리독신 생합성 관련 기능을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

### 【청구항 9】

제6항에 있어서,

상기 폴리펩티드는 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열과 90 % 이상의 서열 상동성을 지니는 것을 특징으로 하는, 피리독신 생합성 관련 기능을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

### 【청구항 10】

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항 기재의 폴리뉴클레오티드에 의하여 코딩되는 피리독신 생합성 관련 기능을 갖는 폴리펩티드.

### 【청구항 11】

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항 기재의 피리독신 생합성 관련 기능을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 대한 안티센스 뉴클레오티드.

## **【청구항 12】**

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항 기재의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터.

## **【청구항 13】**

제12항 기재의 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체.

## **【청구항 14】**

제13항에 있어서,

상기 형질전환체는 형질전환된 대장균인 것을 특징으로 하는 형질전환체.

## **【청구항 15】**

서열번호 2에 기재된 아미노산 서열 또는 그와 유사한 서열로 이루어진 피리독신 생합성 관련 기능을 갖는 폴리펩티드의 발현 또는 그 기능을 억제하는 단계를 포함하는, 식물의 생장을 억제하는 방법.

## **【청구항 16】**

제15항에 있어서,

상기 단계는 제11항 기재의 안티센스 뉴클레오티드를 식물체내에 도입하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 식물의 생장을 억제하는 방법.

## **【청구항 17】**

제15항에 있어서,

상기 단계는, 제11항 기재의 안티센스 뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터

를 식물체내에 도입하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 식물의 생장을 억제하는 방법.

### 【청구항 18】

제15항에 있어서,

상기 단계는 제11항 기재의 안티센스 뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체를 식물체내에 도입하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 식물의 생장을 억제하는 방법.

### 【청구항 19】

제15항에 있어서,

상기 단계는 제11항 기재의 안티센스 뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 아그로박테리움 튜미파시엔스를 식물체내에 도입하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 식물의 생장을 억제하는 방법.

### 【청구항 20】

제15항에 있어서,

상기 단계는 유전자 제거, 유전자 삽입, T-DNA 도입, 동종 재조합, 트랜스포전 태경 및 siRNA으로 구성된 군에서 선택된 어느 한 가지 방식에 의하여 수행되는 것임을 특징으로 하는, 식물의 생장을 억제하는 방법.

### 【청구항 21】

서열번호 2에 기재된 아미노산 서열 및 그와 유사한 서열로 이루어진 피리독

신 생합성 관련 기능을 갖는 폴리펩티드의 발현 또는 기능을 억제하는 물질을 검출하는 단계를 포함하는, 식물의 생장을 억제하는 물질의 스크리닝 방법.

### 【청구항 22】

제21항에 있어서,

상기 물질은 제11항 기재의 안티센스 뉴클레오티드인 것을 특징으로 하는, 식물의 생장을 억제하는 물질의 스크리닝 방법.

### 【청구항 23】

제21항에 있어서,

상기 물질은, 제11항 기재의 안티센스 뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터인 것을 특징으로 하는, 식물의 생장을 억제하는 물질의 스크리닝 방법.

### 【청구항 24】

제21항에 있어서,

상기 물질은, 제11항 기재의 안티센스 뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체인 것을 특징으로 하는, 식물의 생장을 억제하는 물질을 스크리닝 하는 방법.

### 【청구항 25】

제21항에 있어서,

상기 물질은, 제11항 기재의 안티센스 뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 아그로박테리움 투미파시엔스인 것을 특징으로 하는, 식물의 생장을

억제하는 물질을 스크리닝 하는 방법.

### 【청구항 26】

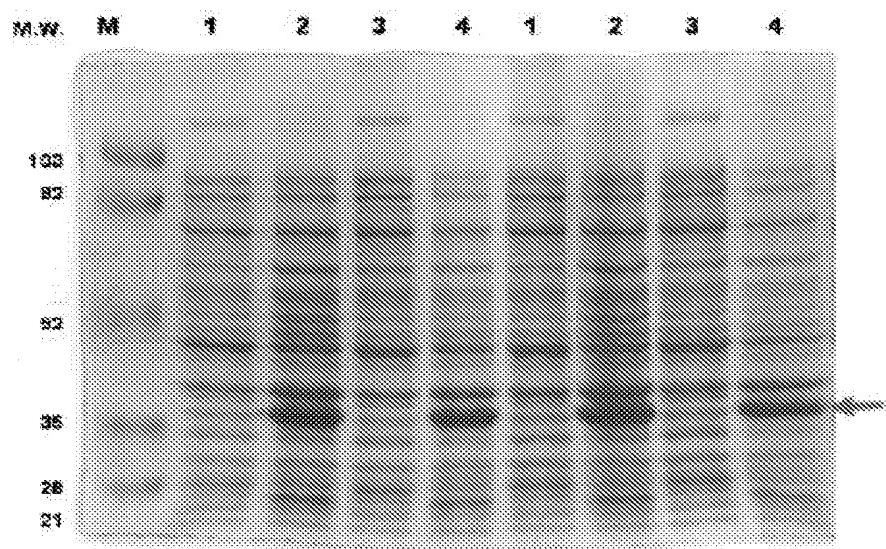
제21항 내지 제25항의 방법에 의하여 스크리닝된 물질을 포함하는, 식물의 생장 억제용 조성물.

〔도면〕

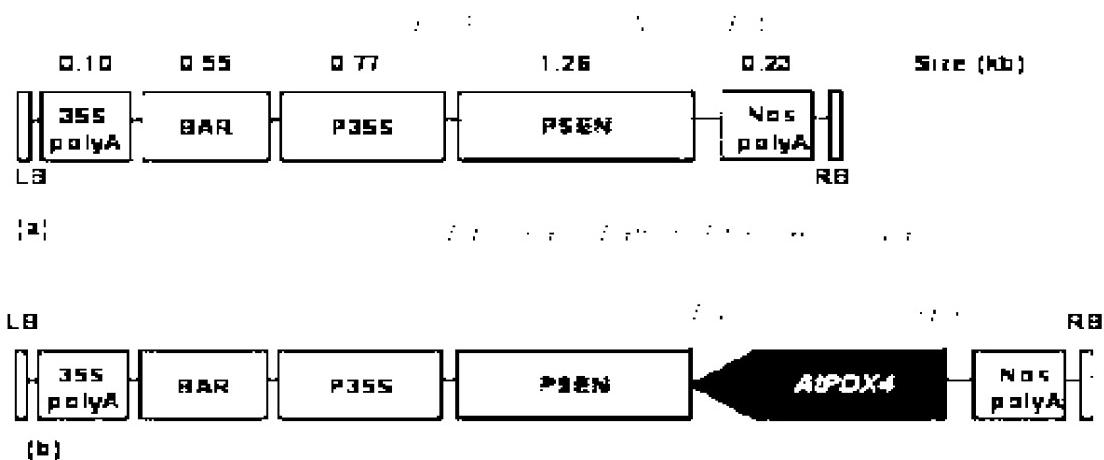
[도 1]

At5g10410	-----MEG--TGVVAVYVGNGAITEAK-KSPFSVKVGLAQMLRGGVIMDVVNAEQARIAE 52
At2g38230	-----MAG--TGVVAVYGE GAMTEKQKSPFSVKVGLAQMLRGGVIMDVVNAEQARIAE 53
At3g16050	MADQAMTDQDQGA VTLYSGT AITDAKKNPHFSVKVGLAQMLRGGVIMDVVNAEQARIAE 60
snz3	-----MS-----EFVKVTGLAQM LKGGVIMDVVTPEQAI AER 33
snz2	-----MS-----EFVKVTGLAQM LKGGVIMDVVTPEQAI AER 33
snz1	-----MTG-----EDFKIKS GLAQM LKGGVIMDVVTPEQAKI AEK 35
	* . * : * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
At5g10410	AGACAVMALERVPADIRAQGGVARMSDPQMIKEIKQAVTIPVMAKARIGHFVEAQILEAI 112
At2g38230	AGACAVMALERVPADIRAQGGVARMSDP EMIKEIKNAV TIPVMAKARIGHFVEAQILEAI 113
At3g16050	AGACSVIVSD----PVRSRGGVRRMPDPV LIKEVKRAVSVPVMARARVGHFVEAQILES 116
snz3	AGACAVMALERIPADM RKS QGQVCRMSDP RMIKEIMEAVSIPVMAKVRIGHFVEAQILEEL 93
snz2	AGACAVMALERIPADM RKS QGQVCRMSDP RMIKEIMEAVSIPVMAKVRIGHFVEAQILEEL 93
snz1	SGACAVMALESIPADM RKS QGQVCRMSDP KMIKD IMNSVSIPVMAKVRIGHFVEAQI EAL 95
	: * : * : . : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
At5g10410	GIDYIDESEVLT LADEDHHINKHNFRIPFVCGCRNLGEALRRIREGAAMIRTKG-EAGTG 171
At2g38230	GVDYVDESEVLT LADEDNHINKHNFKIPFVCGCRNLGEALRRIREGAAMIRTKG-EAGTG 172
At3g16050	AVDYIDESEIISVADDHFINKHNFRSPFICGCRDTGEALRRIREGAAMIRI QGDLTTATG 176
snz3	QVDYIDESEVLT PADWTHHIEKHNFVKPVFCGAKDLGEALRRINEGAAMIRTKG-EAGTG 152
snz2	QVDYIDESEVLT PADWTHHIEKHNFVKPVFCGAKDLGEALRRINEGAAMIRTKG-EAGTG 152
snz1	EVDVIDESEVLT PADWTHHIEKDFFKPVFCGAKDLGEALRRINEGAAMIRTKG-EAGTG 154
	: * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
At5g10410	NIEAVRHRSVNGDIRVLRN--MDDDEVFTFAKKLAAPYDLMQTKQLGR LPVVQFAAG 229
At2g38230	NVVEAVRHRSVNGAIRLLRS--MDDDEVFTYAKKIAAPYDLMVQT KELGR LPVVQFAAG 230
At3g16050	NIAETVKNVRSLMG EVRVLNN--MDDDEVFTFAKKISAPYD LVQATKQMG RLPVVQFASG 234
snz3	DVSEAVKHITKIKAEIQQYKENLKTESDFAAKATEL RVPV DLLK TTLSEG KLPVV NFAAG 212
snz2	DVSEAVKHITKIKAEIQQYKENLKTESDFAAKATEL RVPV DLLK TTLSEG KLPVV NFAAG 212
snz1	DVSEAVKHIRRTEE IAKCQQ-LKSEDDIAKVAEE MRPVPSLLK DVLEKGKLPVV NFAAG 213
	: * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
At5g10410	GVATPADAALMMQLGCDGVFGSGIFKSGDPARRARAIVQAVTHYS DPPEML VEVSCGLGE 289
At2g38230	GVATPADAALMMQLGCDGVFGSGIFKSGDPV KRAKAIVQAVT NYRDAAVL AEVSCGLGE 290
At3g16050	GITTPADAALMMQLGCDGVFGSEVF DGPDPFKKLRSIVQAVQHND PHVLAEMSSGLEN 294
snz3	GVATPADAALLMQLGCEGVFGSGIFKSSDPEKLACAIVEATTHYDNPAKLLQVSSDLGD 272
snz2	GVATPADAALLMQLGCEGVFGSGIFKSSDPEKLACAIVEATTHYDNPAKLLQVSSDLGD 272
snz1	GVATPADAALLMQLGCDGVFGSGIFKSSNPVRLATAVV EAATTHFDNPSKLLLEVSSDLGE 273
	: * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
At5g10410	AMVGINLN DEKVERFANRSE----- 309
At2g38230	AMVGLNLD -KVERFASRSE----- 309
At3g16050	AMESLNVRGDR IQDFGQGSV----- 314
snz3	LMGGISIQSINEAGGKNGARLSEIGW 298
snz2	LMGGISIQSINEAGGKNGARLSEIGW 298
snz1	LMGGVSI SISHAS--NGVRLSEIGW 297

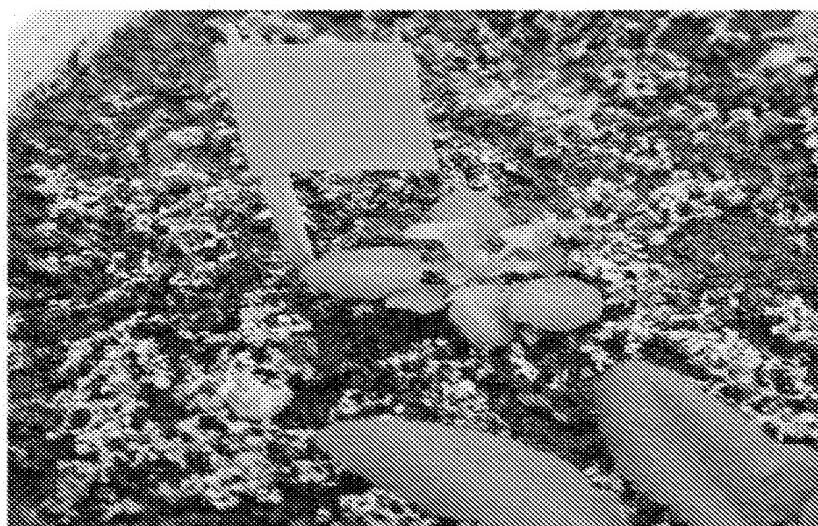
【도 2】



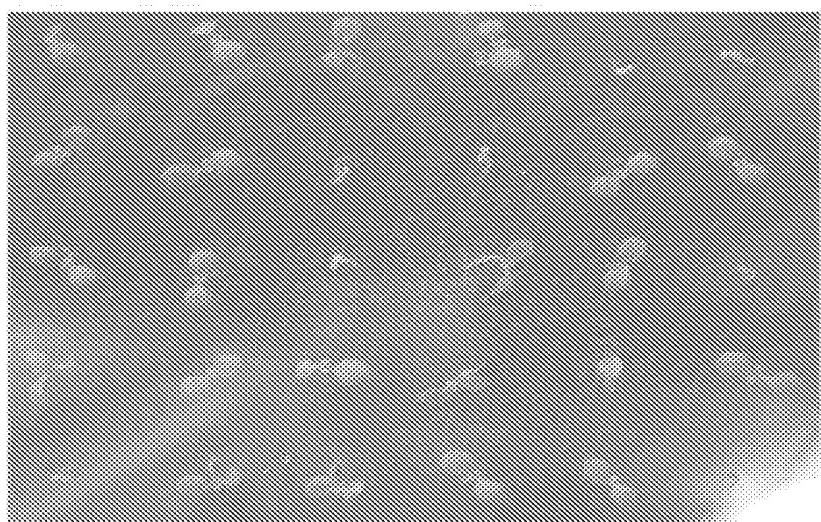
### 【도 3】



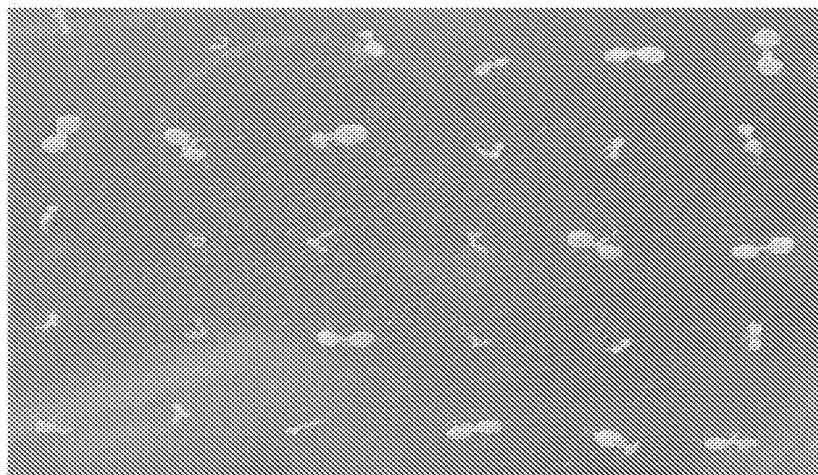
【도 4】



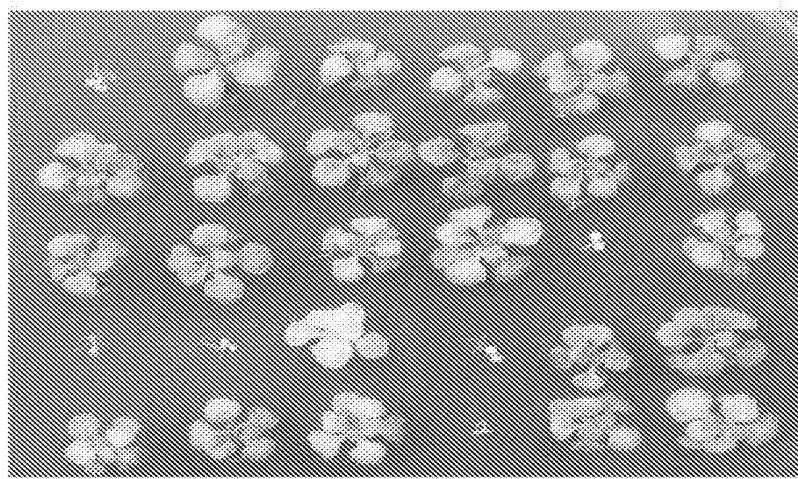
【도 5a】



【도 5b】

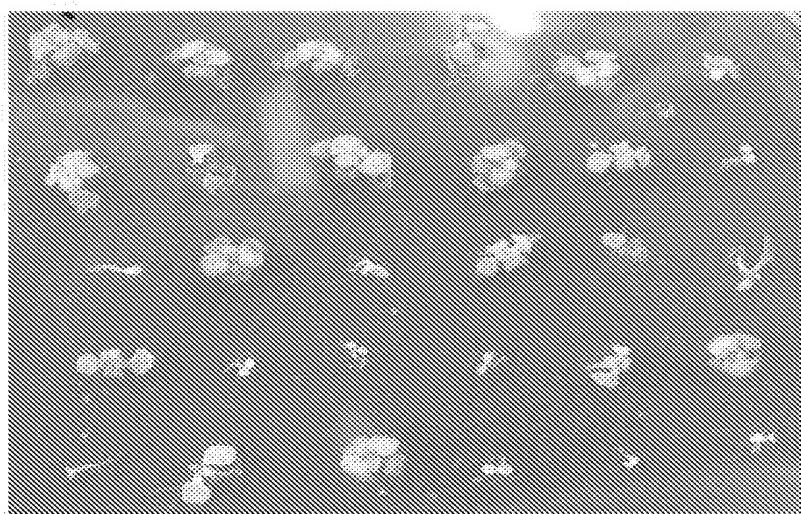


【도 5c】

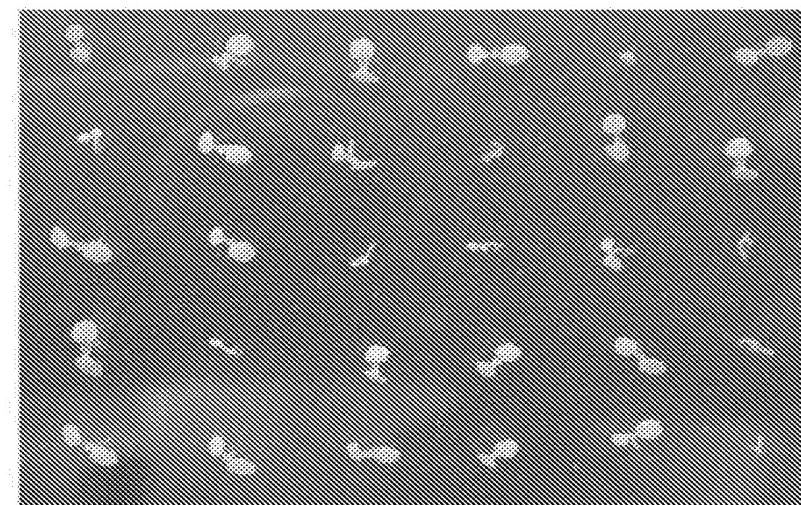




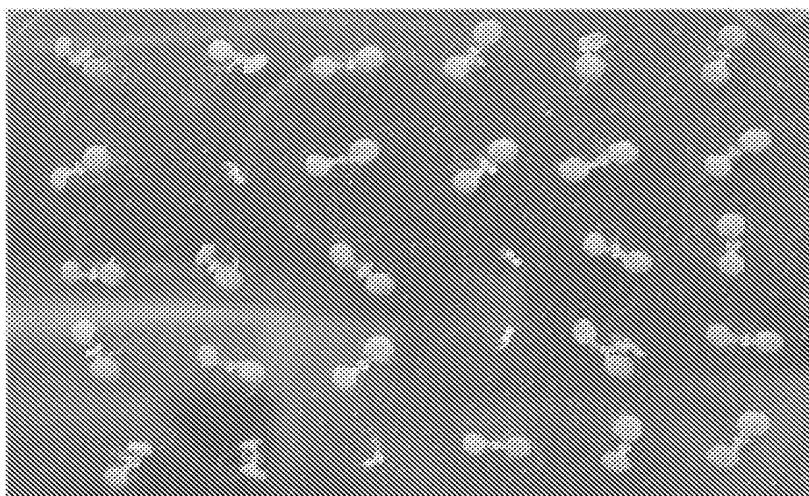
【도 5d】



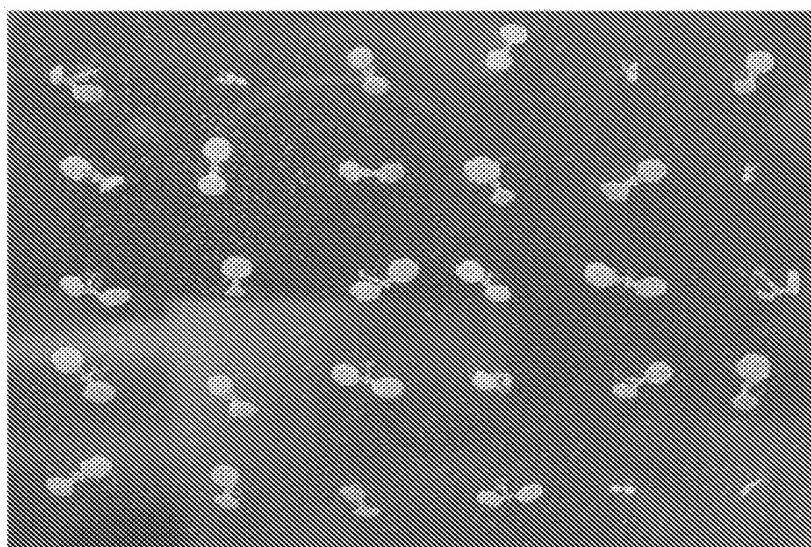
【도 6a】



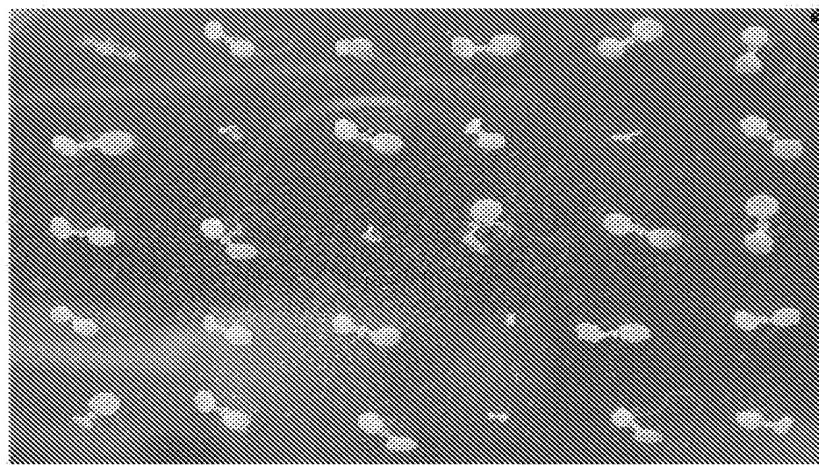
【도 6b】



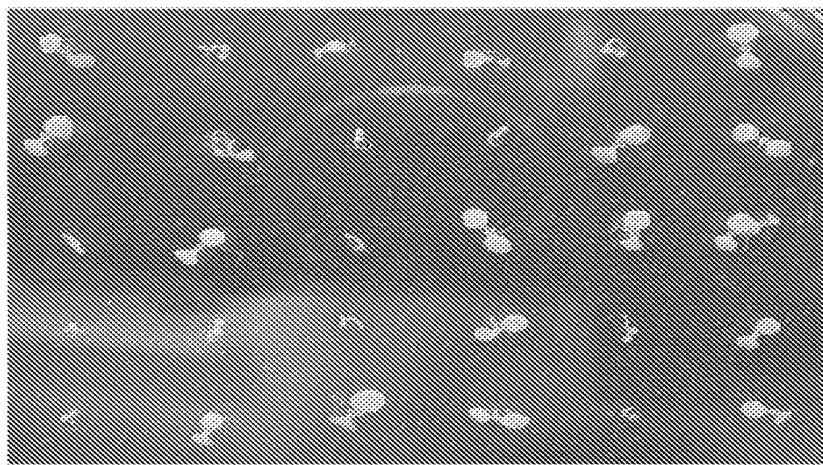
【도 6c】



【도 6d】



【도 6e】



## 【서열목록】

<110> GENOMINE INC.  
KOREA RESEARCH INSTITUTE OF CHEMICAL TECHNOLOGY  
<120> Polynucleotide Coding Polypeptide Having Function Related to  
Pyridoxine Biosynthesis  
<160> 6  
<170> KopatentIn 1.71  
<210> 1  
<211> 1297  
<212> DNA  
<213> Arabidopsis thaliana  
<400> 1

tcactataaa gccgatccat agataaacga ggaccggcca gaaatcgctt caccattccc 60  
aaatctctc tccatttct ccacacaaat ttcttcaa tctccgataa tggaggaaac 120  
cggcggttg gcggtgtacg gtaacggtag gataacggag gcaagaat ctcccttc 180  
cgtgaaggc tcgttggctc agatgcctcg tggtgggtt atcatggatg tcgtcaacgc 240  
cgagcaagct cgtatcgccg aggaggctgg tgcttgcgc gtcattggctt tggagcgtgt 300  
tcctgctgat atcccgctc aaggaggcgt cgctcgatg agcgatccac aaatgattaa 360  
agaaaatcaaa caagccgtt cgttccgggt gatggctaag gctaggattt gtcatttcgt 420  
tgaagctcag atccttgaag caatttggat cgattacatc gatgagagcg aggttttgc 480  
tcttgctgat gaagatcatc acatcaacaa gcataattt cggatccgt tcgttgcgg 540  
ttgccggaat ctggcgagg ctctgaggag gatccgtgaa ggtgcggcga tgattaggac 600  
caaaggtaa gctggaaaccg gtaacattat tgaagctgtg aggcatgtga ggtctgttaa 660  
tggtgacatt agggtttgc gaaacatgga tggatgtgatg gtttcaatt tcgctaaagaa 720  
attagccgtt ccgtacgatc tcgttgatgca gactaaggcg ctggcgatc ttcctgttgt 780  
ccaaattcgcc gcccggggag tggctactcc ggctgtatgca gctctatgat tgcagcttgg 840  
atgtgtatgtt gtctttgttg gtttctgttat ctcaagagc ggtgacccag ctgcgtgtgc 900  
acgtgccatt gttcaggctg tgactcatta cagtggccct gagatgttg tggaggtgag 960  
ctgtggctt ggagaagcca tgggtggat caatctcaac gatgagaagg ttgagaggtt 1020  
cgctaattcgcc tccgagtgat caaagaaata aaaggtaaaa tatctcagac gaaatggttt 1080  
cagaatttcc tcaaccatt ttgcgtatc ctcttggaaa agaagaagat gatgatattt 1140  
ttggtagttt gttatcctt gttttccctt ataatctttagt atgtctttt gttattgtaa 1200  
ctcgtaatcc ctgtcaaga acaagttgt cagtataat aatgtactac tctcttgatc 1260  
gatcagttgg ttttgaatct gatataatttc tcgtatcc 1297

<210> 2

<211> 309

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 2

Met Glu Gly Thr Gly Val Val Ala Val Tyr Gly Asn Gly Ala Ile Thr  
1 5 10 15 Glu Ala Lys Lys Ser Pro Phe Ser Val Lys Val  
Gly Leu Ala Gln Met  
20 25 30  
Leu Arg Gly Gly Val Ile Met Asp Val Val Asn Ala Glu Gln Ala Arg  
35 40 45  
Ile Ala Glu Glu Ala Gly Ala Cys Ala Val Met Ala Leu Glu Arg Val  
50 55 60  
Pro Ala Asp Ile Arg Ala Gln Gly Gly Val Ala Arg Met Ser Asp Pro  
65 70 75 80  
Gln Met Ile Lys Glu Ile Lys Gln Ala Val Thr Ile Pro Val Met Ala  
85 90 95  
Lys Ala Arg Ile Gly His Phe Val Glu Ala Gln Ile Leu Glu Ala Ile  
100 105 110  
Gly Ile Asp Tyr Ile Asp Glu Ser Glu Val Leu Thr Leu Ala Asp Glu  
115 120 125  
Asp His His Ile Asn Lys His Asn Phe Arg Ile Pro Phe Val Cys Gly  
130 135 140  
Cys Arg Asn Leu Gly Glu Ala Leu Arg Arg Ile Arg Glu Gly Ala Ala  
145 150 155 160  
Met Ile Arg Thr Lys Gly Glu Ala Gly Thr Gly Asn Ile Ile Glu Ala  
165 170 175  
Val Arg His Val Arg Ser Val Asn Gly Asp Ile Arg Val Leu Arg Asn  
180 185 190  
Met Asp Asp Asp Glu Val Phe Thr Phe Ala Lys Lys Leu Ala Ala Pro  
195 200 205  
Tyr Asp Leu Val Met Gln Thr Lys Gln Leu Gly Arg Leu Pro Val Val  
210 215 220  
Gln Phe Ala Ala Gly Gly Val Ala Thr Pro Ala Asp Ala Ala Leu Met  
225 230 235 240  
Met Gln Leu Gly Cys Asp Gly Val Phe Val Gly Ser Gly Ile Phe Lys  
245 250 255

Ser Gly Asp Pro Ala Arg Arg Ala Arg Ala Ile Val Gln Ala Val Thr

260 265 270

His Tyr Ser Asp Pro Glu Met Leu Val Glu Val Ser Cys Gly Leu Gly

275 280 285

Glu Ala Met Val Gly Ile Asn Leu Asn Asp Glu Lys Val Glu Arg Phe

290 295 300

Ala Asn Arg Ser Glu

305

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sense primer

<400> 3

gaagatctat ggaaggaacc ggcgttgtgg 30

<210> 4

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Antisense primer

<400> 4

cgaagcttt ataactgaca aacctgttct tg 32

<210> 5

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sense primer

<400> 5

gaagatctca ctcggagcga ttagcgaac 29

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Antisense primer

<400> 6

gctctagatg gaaggaacctgcgttgtggc

30